

氏名	Liliana Missana
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	歯 学
学位授与番号	博 甲 第 1228 号
学位授与の日付	平成 6 年 3 月 25 日
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻 (学位規則第 4 条第 1 項該当)
学位論文題目	Morphological and Morphometrical Studies of Bone and Cartilage Formations Induced by various BMP-carrier Composites (各種BMP-支持体による異所性骨誘導の形態学的, 形態計測学的研究)
論文審査委員	教授 永井 教之 教授 谷口 茂彦 教授 西嶋 克巳

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

【緒言】

BMP (Bone Morphogenetic Protein) は, 成長分化因子の一つで, 未分化間葉細胞に作用して骨を形成する特異な活性を持つタンパク質であることが知られている。BMP は新しい生体材料として期待されているが, BMPを動物に投与して異所性に大量の骨形成を起こさせるためには, BMPを単独ではなく, 何らかの支持体にBMPを結合させて埋入することが必要である。本研究では, BMP支持体の骨形成細胞分化の誘導現象を明らかにすることを目的としている。支持体として5種類を用い, BMPを組み合わせて異所性骨誘導実験を行い, その骨形成過程を形態学的・形態計測学的に比較検討した。

【材料と方法】

1. BMPの抽出・精製: 湿性重量 1 kgの牛骨粉 (粒径150~840 μ m) より久保木らの方法 (1991) に従ってcrude BMPを抽出した。次にカラムクロマトグラフィーを用い3rd step BMPを精製品とした。

1st step Hydroxyapatite colum, 2nd step Heparin-Sepharose CL-6B colum

3rd step Sephacryl S-300 HR-LK gel colum

支持体は次の通りである。

1. IBM (脱灰骨粉末, グアニジン不溶性抽出基質, Reddiの方法, 20-60メッシュ)
2. PPHAP (porous particle HAP) 気孔率70%, 1,200℃焼結体, 5×5×3 mm
3. CB (コラーゲン, 湿潤(CBw)と乾燥(CBd)) 高研製コラーゲン, ミクロスフェア (直径0.5~1.00mm)
4. FCM (強化コラーゲン線維膜, 久保木 1991 歯科基礎誌)
5. FGM (ガラス繊維膜, Advantic GA100, 10×5 mm)

2. BMP支持体複合体の作製

A群 (IBM, CBw, FCM, FGM) の場合: IBM, CBw, FCM, FGM) の場合: IBM 20mg, CBw 3 mg, FGM(10×5×1 mm) 6 mg, FGM(10×5 mm)55 gを精製。BMP 0.3mg (0.1% trifluoroacetic acid液0.05ml) とを混合した後, 凍結乾燥した。その後, 各複合体はリン酸緩衝食水と混合し, 1 mlの注射筒に入れた後埋入した。

B群 (PPHAP) の場合: まずPPHAP70mgを1 mlの注射筒に入れた。ついでBMP 0.3 mg (0.1% trifluoroacetic acid液 0.05ml)を1.0M Tris緩衝液で中性化したあと, 注射筒にいれ, PPHAPに食浸させた。そのまま凍結乾燥保存し, 使用直前に室温にもどし, 埋入した。

C群 (CBd) の場合: CBd 3 mgをBMPとの混合前に凍結乾燥し, ついでBMP 0.3mg (0.1% trifluoroacetic acid液 0.05ml)と混合, 1 mlの注射筒に入れた後埋入した。

3. 実験動物と埋入方法: 実験動物として, 雄性, 4週齢のWistar系ラット60匹 (体重: 約70 g) を使用した。背部に左右それぞれ2ヶ所, 計4ヶ所に約10mmの皮下切開を加え, 各BMP+支持体と対照として支持体のみを切開創から十分離れた部位に挿入した。
4. 標本の作成法: 埋入後1, 2, 3週目に屠殺し, ペレットを一塊として摘出した。摘出物は, 10%中性ホルマリンで固定後, 10%蟻酸で7日間脱灰した。その後, 通法に従いエタノールで脱水後, パラフィン包埋し, 4 μmの切片を作製, ヘマトキシリン-エオジン染色を施し, 光学顕微鏡で観察した。
5. 形態計測法: 5種類のBMP+支持体の各群から3ブロックを選び, 標本を作成した。光学顕微鏡写真 (25倍) を作製, 標本の全面積の組写真 (各組30~50枚構成) を作成した。Weibelの形態計測法 (196test point) 格子により計測した。各パラメーターは, 間葉系結合織 (m-ct), 支持体 (cr), 軟骨様組織 (ch), 軟骨 (Ct), 骨 (b), 骨髄組織 (bm)とした。

【結果】

組織学的所見

1. BMP+IBM: 埋入1週で軟骨がIBM界面に認められ, 2週目でそれらは線維性骨にも置換していく。又, IBM界面にも添加性骨化が認められIBM自身も再石灰化する。支持体は, 次第に吸収されていく。しかし, 間葉系結合織内には好酸球の出現を認める。

- 3週目では支持体は著減し、軟骨は消失するが、線維骨、骨髄様組織が増加する。
2. BMP+PPHAP：埋入1週間で、多孔PHAP界面に直接極く少量の骨が形成された。2週間で骨が増加するが、軟骨は形成されない。3週目でも支持体は吸収されず、添加性の線維骨は骨髄腔を伴って増加する。
 3. BMP+CB：BMP+CBdの埋入1週間目で、軟骨性骨化のみが出現し、埋入2週目で軟骨は減少し骨形成が増加する。3週目における軟骨は消失し、線維骨・骨髄様組織が増加した。又、BMP+CBwでは軟骨形成を認めず、支持体に添加性骨化を示したが量的に少ない。
 4. BMP+FCM：FCM界面に1週目に少量の軟骨がみられるが、骨形成は出現しない。2週目で、軟骨形成と共に別の領域で添加性の骨形成が増加し、支持体は吸収をうける。3週目では、支持体は更に減少、骨・骨髄腔は増加する。
 5. BMP+FGM：1週目でFGM周囲は内層は軟骨様組織、外層は異物肉芽様組織となる。2週目で軟骨は内方へ向かって形成され、外層には軟骨と連続して繊維性骨がみられると共に独立して骨形成を認める。3週目では、軟骨は更に増加し、外層に骨髄を伴う骨形成を認める。
 6. 5種類の支持体単独埋入では、その界面には骨形成はなく、1週、2週3週と繊維性組織に被包され、マクロファージ、多核巨細胞の出現をみた。

形態計測的結果

1. BMP-IBMでは、1週目で軟骨が4%であり、2週目以降は減少して3週目で消失した。新生骨は、2週目で15%を占め、3週目で22%に増加していた。骨髄は3週目で48%を占めていた。支持体は1週目で47%、2週目で24%、3週目で2%に著減した。
2. BMP-PHAPでは、支持体は1～3週はほぼ同じ面積を示した。新生骨は1週目で0.3%であり、3週目13%と増加した。また骨髄は1.4%を占めた。
3. BMP+CBDSdでは、軟骨が1週目で15%、2週目で2%であり、3週目で0.7%に減少していた。一方、新生骨は1週目で10%、2週目で20%そして3週目で14%となり、これに骨髄7%を占めていた。BMP-CBDSwでは、新生骨が3%を占め、支持体の占有面積は1～3週でほとんど変化なかった。
4. BMP-FCMでは、支持体が1週目で68%であったが、3週目で19%に減少していた。軟骨は1週目で0.5%、2週目で11%と増加し、3週目で10%であった。また、骨は1週目で19%で3週目まで増加し、26%となった。骨髄は3週目で18%を占めていた。
5. BMP-FGMでは、軟骨様組織が1週目で20%であるが、2週目で軟骨が27%となった。新生骨は、2週目で3.1%、3週目で8%に増加し、また骨髄は2%であった。

【まとめと考察】

各BMP+支持体の骨形成様式と量的割合は、支持体の種類により明らかな差異を認めたが、骨形成様式に3つのTypeが示唆された。第1のType (BMP-IBM, BMP-CBd,

BMP-FCM) は軟骨性骨化と膜性骨化の両者が認められた。特にBMP-IBM, BMP-C Bdは、軟骨性骨化が早期に認められるのに対し、BMP-FCMは遅れて出現してくることを特徴としている。第2のType, BMP-HAP, BMP-CBwでは、直接支持体に骨が添加するか又は、少量の膜性骨化を示し、軟骨は形成されなかった。第3のType, BMP-FGMでは明らかな軟骨性骨化が認められたが、膜性骨化の存在は不明であった。このようなBMP-支持体による異所性組織での骨誘導様式は支持体の構造、化学構造及びそれによって構築される微小環境に左右されることが示唆された。今回の結果から、異所性骨誘導能を中心に考えれば、生体材料としてのBMP支持体の組み合わせは、BMP-FCM, BMP-PPHAPとそしてBMP-CBdが利用できると思われる。

論文審査の結果の要旨

本研究は新しい生体材料として期待されているBMP (Bone Morphogenetic Protein) による骨形成細胞への分化誘導現象を明らかにする目的で、BMPと5種類の支持体を用いて異所性骨誘導実験を行ない、形態学的、形態計測学的に比較検討したものである。

BMPは牛骨粉よりSephacryl S-300 HR-LK gel columnによりcrude BMPとして抽出した。支持体として脱灰骨粉末、多孔質HAP、コラーゲンビーズ、強化コラーゲン線維膜、ガラス線維膜を用いた。各BMP+支持体の骨形成様式と量的割合は、各BMP-支持体によって差が認められた。骨形成様式としては、軟骨性骨化のみの場合、軟骨性骨化と膜性骨化が同時に認められる場合、支持体への直接添加と膜性骨化を示すが軟骨は形成されない場合が確認された。骨誘導様式は支持体の構造、化学組成および支持体周囲の微小環境に左右されることが示唆された。

これらの知見はBMP-支持体による異所性骨誘導の研究と支持体の開発に価値ある研究業績である。よって申請者は博士(歯学)の学位を得る資格があると認める。